Erlangen, 1960.

Über den Einfluß von Methyl-bis-ß-chloraethylamin-hydrochlorid (Dichloren) und Trichlortriaethylamin-chlorhydrat (Sinalost) auf den CoA-Gehalt von Leber, Herz und Gehirn weißer Mäuse

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

von

Karola Ferber

aus Berlin-Pankow

1960 №106

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. F. H e i m

Über den Einfluß von Methyl-bis-ß-chloraethylamin-hydrochlorid (Dichloren) und Trichlortriaethylamin-chlorhydrat (Sinalost) auf den CoA-Gehalt von Leber, Herz und Gehirn weißer Mäuse.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen

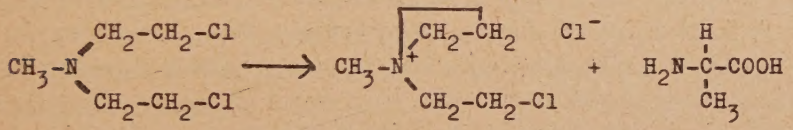
Vorgelegt von
Karola F e r b e r
aus Berlin-Pankow

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen.

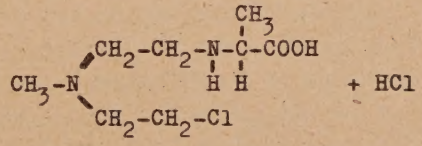
Dekan: Prof. Dr. F. Heim
Referent: Prof. Dr. F. Heim
Tag der mündlichen Prüfung: 11.7.1960

Über den Einfluß von Methyl-bis-ß-chloraethylamin-hydrochlorid (Dichloren) und Trichlortriaethylamin-chlorhydrat (Sinalost) auf den CoA-Gehalt von Leber, Herz und Gehirn weißer Mäuse.

Die cytostatische und cytotoxische Wirkung des Stickstofflost und seiner Derivate, Methyl-bis-ß-chloraethylamin-hydrochlorid (Dichloren) und des Trichlortriaethylamin-chlorhydrat (Sinalost), wird mit der Fähigkeit dieser Verbindungen erklärt, im alkalischen Milieu, also auch in der Gewebsflüssigkeit, cyklische Immoniumverbindungen zu bilden, nach folgender Gleichung:



Methyl-bis-ß-chloraethylamin — Immoniumsalz — Aminosäure



alkylierte Aminosäure

Diese sind imstande, mit den Amino-Karboxyl- und Sulfatanteilen von Aminosäuren, Nucleotiden, Nucleinsäuren, Proteinen und Nucleoproteiden zu reagieren. Insbesondere erscheint die Desoxyribonucleinsäuresynthese und somit die Bildung der am Kernaufbau beteiligten Nucleoproteide durch diese Stoffe gehemmt zu werden. Nach PODOLSKY und John O. HUTCHENS werden in der Hefe zur gleichen Zeit die Teilungsvorgänge und die Protein- und Nucleinsäure-Syntheser am

stärksten gehemmt. WHEELER und SKIPPER fanden, daß Stickstofflost stärker in die Purinfraktion der Ribonucleinsäure als in den Kohlenhydratanteil, der die Nucleinsäure aufbauenden Nucleotiden, eingebaut wird. Nach den Beobachtungen von DRYSDALE, HOPKINS, THOMSON, SMELLIE und DAVIDSON wird durch Stickstofflost die Nucleinsäuresynthese deutlich herabgesetzt. Doch bleibt es noch ungewiß, ob durch Hemmung der Phosphorylierung der Mononucleotide oder der Kondensation von Di- und Triphosphaten zu Polynucleotiden. Die Synthese der Mononucleotiden wird kaum beeinflußt. Von CRATHORN und HUNTER konnte gezeigt werden, daß die Hemmung des Einbaues von markierten Aminosäuren in Bakterienzellen (Staphylococcus aureus) etwa parallel der cytostatischen Wirkung des Stickstofflosts geht. LAWLEY fand, daß nach Behandlung von Desoxyribonucleotiden (Desoxyguanylsäure, Desoxyadenylsäure, Desoxycytidylsäure, Thymidylsäure) bzw. Kalbsthymus-Desoxyribonucleinsäure mit Stickstofflost Reaktionsprodukte auftreten, die durch Chromatographie isoliert werden können. Man erhält am Zucker, am Phosphat als auch an der Base alkylierte Produkte. Andere Autoren, wie HAROLD und ZIPORIN, fanden, daß Stickstofflost in sehr niedriger Konzentration bei Escherichia coli die Zellteilung hemmt, ohne die Desoxyribonucleinsäure bzw. Proteinsynthese zu beeinflussen. Letzteres geschah erst bei höheren Konzentrationen. CLARK, GOODLAD und MUNRO fanden, daß Stickstofflost in 2×10^{-5} mol. Konzentration den Phosphateinbau und erst bei 9×10^{-5} mol. Konzentration den Glykokolleinbau in Leberschnitte hemmt. Wurde im gleichen Ansatz der Einbau von C^{14}- Phenylalanin in Leberprotein mit der p-Aminohippursäurebildung aus Glycin und p-Aminobenzoesäure verglichen, so ergab sich für beide Reaktionen bei einer Konzentration von 5×10^{-5} mol. eine Hemmung von 50 %. Die Autoren schließen aus diesen Versuchen, daß Stickstofflost nicht primär bei der Proteinsynthese angreift, sondern allgemein synthetische Prozesse hemmt. Nun gehört die

Bildung der p-Aminohippursäure aus p-Aminobenzoesäure und Glykokoll zu den Reaktionen, an denen CoA maßgeblich beteiligt ist. Wie überhaupt eine große Zahl von Synthesen, so z.B. alle Acetylierungsprozesse im Körper, der Aufbau der Fettsäuren, die Bildung von Steroiden, Karotinoiden, Porphyrinen und Steroidhormonen an die Mitwirkung des CoA gebunden sind. Da nicht auszuschließen ist, daß die aus Stickstofflost entstehenden Immoniumverbindungen auch mit der aktiven Sulfydrilgruppe des CoA reagieren oder aber durch Bindung an die Phosphatgruppe des CoA deren Wirkung bzw. Synthese hemmt, haben wir in vivo den Einfluß von Methyl-bis-ß-chloraethylamin und Trichlortriaethylamin auf die CoA-Aktivität von Leber, Herz und Hirn weißer Mäuse untersucht. Es wurden hierbei die genannten Verbindungen in einer Konzentration von 0,025 Mikromol pro Gramm Körpergewicht angewandt und intravenös verabreicht. Dosen, an denen die Tiere innerhalb von 3-5 Tagen fast ausnahmslos zu Grunde gingen.

Die Versuche wurden an weißen Mäusen durchgeführt. Die zu untersuchenden Verbindungen wurden in Aqua dest. bzw. physiologischer Kochsalzlösung gelöst und intravenös in die Schwanzvene injiziert. Nach 4, 24 und 48 Stunden wurden die Tiere getötet. Jede Versuchsgruppe bestand aus 8 - 18 Tieren. Die Tötung erfolgte durch Eintauchen in flüssige Luft mit anschließender Decapitation und sofortigem Entnehmen von Gehirn, Herz und einem Stück Leber. Die Organe wurden im Mörser unter Zugabe von flüssiger Luft zerrieben, gewogen und mit der dreifachen Menge Aqua dest. versetzt, anschließend 2 1/2 Minuten im Wasserbad gekocht, homogenisiert und 15 Minuten bei 15 000 Umdrehungen abzentrifugiert. Im Organextrakt wurde anschließend der Gehalt an CoA bestimmt nach der Methode von KAPLAN-LIPMANN und BRATTON-MARSHAL: Man pipettiert in eine numerierte Reihe von Zentrifugengläser 0,02 ml einer frisch bereiteten 1 m $NaHCO_3$-

Lösung, 0,04 ml 0,11 m Gluthation-Lösung, 0,067 ml Reaktionsgemisch (96 mg ATP ad 3 ml Aqua dest., 3 ml 0,2 m Natriumcitrat, 0,375 ml 1 m Natriumacetat), 0,033 ml 0,006 m Sulfanilamidlösung, verschiedene bestimmte Mengen einer reinen CoA-Lösung und 0,06 ml gealtertes Taubenleberferment. (Herstellung nach KAPLAN-LIPMANN)

Bei 37°C 2 Stunden im Thermostaten inkubieren lassen. Darnach in jedes Zentrifugenglas 1 ml 5 %iger CCl_3COOH zugeben und das ausgefällte Eiweiß 5 Minuten bei 10 000 Umdrehungen abzentrifugieren. Den Überstand in Reagenzgläser abgießen und aus jedem dieser Gläser 0,6 ml Flüssigkeit in eine neue numerierte Reagenzglasreihe geben, in die vorher 5 ml Aqua dest. pipettiert wurden. Hierauf die Gläser 5-10 Minuten in ein Eisbad stellen. Dann gibt man in jedes Reagenzglas im Abstand von 15 Sekunden (mit der Stoppuhr) 0,6 ml 0,1% $NaNO_2$-Lösung, 3 Minuten nach Beginn der Aktion in jedes Glas, wieder im Abstand von 15 Sekunden, 0,6 ml 0,5 %ige Ammoniumsulaminatlösung und genau 2 Minuten später 0,6 ml 0,1 %iges Naphthyldiamin. Je nach Stärke der Konzentration erfolgt eine mehr oder weniger intensive Violettfärbung, die photometrisch gemessen wird. Nach 20 Minuten liest man am Spektral-Kolorimeter bei einer Wellenlänge von 545 m gegen Aqua dest. die Extinktionen ab.

Die erhaltenen Werte trägt man in ein Koordinatensystem ein, in welchem in der Ordinate die Extinktionen, in der Abszisse die in γ angegebenen Mengen an CoA aufgezeichnet werden. So erhält man eine Eichkurve.

In einem zweiten Arbeitsgang pipettiert man statt der verschiedenen bestimmten Mengen CoA die auf ihren CoA-Gehalt zu prüfenden Substanzen. Die erhaltenen Extinktionswerte liest man an der Eichkurve ab und erhält so die Menge des gesuchten CoA.

Versuchsergebnisse

Wie aus Tabelle I hervorgeht, kommt es nach der intravenösen Injektion von 0,025 µMol/g Trichlortriaethylamin (Sinalost) zur signifikanten Abnahme des CoA der Leber bereits nach 4 Stunden. Auch nach 24 und 48 Stunden ist der CoA-Gehalt der Leber gegenüber dem CoA-Gehalt der Leber der Kontrolltiere signifikant erniedrigt. Der CoA-Gehalt dagegen im Herzen und Gehirn wird durch Sinalost in obiger Dosis nicht signifikant beeinflußt.

Aus Tabelle II geht hervor, daß Methyl-bis-ß-chloraethylamin-hydrochlorid (Dichloren) wiederum den CoA-Gehalt der Leber signifikant erniedrigt. Im Gegensatz zum Trichlortriaethylamin-chlorhydrat jedoch erst von der 24. Stunde an nach Verabreichung der Substanz. Wiederum wird der Gehalt des CoA im Herzmuskel nicht und das CoA des Gehirns nur nach 24 Stunden signifikant erniedrigt.

Die Tatsache, daß die beiden Verbindungen ganz vorwiegend in der Leber eine signifikante Hemmung des CoA hervorrufen, erklärt sich vielleicht aus der Tatsache, daß sich diese Stoffe in der Leber anreichern und dort entgiftet werden. Nach Untersuchungen von TRAMS werden nämlich 30 % des Ratten injizierten Methyl-bis-ß-chloraethylamin innerhalb von 24 Stunden durch die Galle ausgeschieden, wobei die Konzentration 25 - 35 mal größer ist als im Blut.

Zusammenfassung

Im ganzen zeigen die hier mitgeteilten Ergebnisse, daß Methyl-bis-ß-chloraethylamin und Trichlortriaethylamin in letalen Dosen weißen Mäusen verabreicht, nur in der Leber eine nachhaltige Senkung des CoA-Gehaltes hervorrufen, während der CoA-Gehalt anderer parenchymatöser Organe, wie Gehirn und Herzmuskel nicht oder nur vorrübergehend signifikant geschädigt wird. Die cytostatische Wirkung dieser Stoffe kann wahrscheinlich nicht mit einer Hemmung des für so viele Stoffwechselvorgänge wichtigen CoA erklärt werden. Im Gegenteil ist bei Anwendung dieser Stoffe in therapeutischen Dosen mit einer Hemmung des CoA-Gehaltes in Herz und Gehirn wohl kaum zu rechnen, da ihn selbst letale Dosen noch weitgehend unbeeinflußt lassen. Nur in der Leber müßte eventuell auch bei therapeutischen Dosen mit Änderungen der CoA-Aktivität gerechnet werden.

Tabelle I

Die Wirkung von 0,025 µMol Trichlortriaethylamin-chlorhydrat (Sinalost) pro Gramm Tier, intravenös injiziert, auf den CoA-Gehalt von Leber, Herz und Gehirn weißer Mäuse.

Coenzym A in µg/g Leber			
Kontrolltiere	4 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Sinalost/g Tier	24 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Sinalost/g Tier	48 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Sinalost/g Tier
284,0	164,0	196,0	250,0
336,0	150,0	200,0	204,0
328,0	242,0	354,0	204,0
268,0	196,0	300,0	254,0
254,0	320,0	192,0	292,0
158,0	314,0	154,0	210,0
338,0	240,0	318,0	266,0
270,0	162,0	238,0	182,0
330,0	300,0	158,0	232,0
124,0	282,0	286,0	200,0
330,0	184,0	202,0	288,0
288,0	Summe: 2554,0	212,0	190,0
260,0		222,0	238,0
384,0	Mittelwert: 232,1 ± 19,4	296,0	Summe: 3010,0
326,0	P = 0,05	Summe: 3328,0	Mittelwert: 231,5 ± 10,1
292,0		Mittelwert: 237,7 ± 16,6	P = 0,01
440,0		P = 0,05	
Summe: 5010,0			
Mittelwert: 294,7 ± 18,1			

P: Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Kontrollen und denen der jeweiligen Versuchsgruppen sind signifikant, wenn P = 0,05 und weniger.

Tabelle I

Coenzym A in µg/g Herz			
Kontrolltiere	4 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Sinalost/g Tier	24 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Sinalost/g Tier	48 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Sinalost/g Tier
94,0	66,0	60,0	94,8
108,0	106,0	116,0	98,4
81,6	75,6	81,2	95,2
72,0	86,4	110,0	111,2
90,4	80,8	48,4	73,2
96,4	78,8	98,0	93,2
54,8	115,2	105,6	98,4
64,0	109,6	114,4	111,2
115,6	83,6	Summe: 733,6	66,4
94,0	77,2		78,0
92,0	75,2	Mittelwert: 91,7 ± 9,1	103,6
115,2	Summe: 954,4	P = 0,9	99,6
85,6			Summe: 1123,2
98,0	Mittelwert: 86,7 ± 4,7		
102,4	P = 0,7		Mittelwert: 93,6 ± 4,0
87,6			P = 0,5
71,2			
Summe: 1522,8			
Mittelwert: 89,5 ± 4,0			

Tabelle I

Coenzym A in µg/g Gehirn			
Kontrolltiere	4 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Sinalost/g Tier	24 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Sinalost/g Tier	48 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Sinalost/g Tier
38,4	38,0	33,2	23,2
38,4	60,8	40,4	28,4
28,8	35,2	16,8	27,2
42,0	34,0	34,4	46,4
30,4	31,2	46,8	18,0
38,0	30,8	49,6	18,0
34,8	45,6	44,0	36,4
54,0	57,6	42,0	29,6
26,0	40,8	40,8	23,2
46,4	57,2	24,8	42,0
52,0	Summe: 431,2	30,8	23,6
42,8		17,6	44,8
22,4	Mittelwert: 43,1 ± 3,6	Summe: 421,2	52,4
32,4			Summe: 413,2
65,6	P = 0,4	Mittelwert: 35,1 ± 3,0	
53,2			Mittelwert: 31,7 ± 3,1
29,2		P = 0,4	
24,8			P = 0,1
Summe: 699,6			
Mittelwert: 38,8 ± 2,7			

Tabelle II

Die Wirkung von 0,025 µMol Methyl-bis-ß-chloraethylamin-hydrochlorid (Dichloren) pro Gramm Tier, intravenös injiziert, auf den CoA-Gehalt von Leber, Herz und Gehirn weißer Mäuse.

Coenzym A in µg/g Leber			
Kontrolltiere	4 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Dichloren/g Tier	24 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Dichloren/g Tier	48 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Dichloren/g Tier
300,0	332,0	284,0	252,0
190,0	318,0	138,0	220,0
406,0	330,0	268,0	228,0
208,0	276,0	230,0	228,0
378,0	336,0	280,0	244,0
250,0	364,0	130,0	238,0
396,0	260,0	168,0	166,0
440,0	220,0	178,0	188,0
340,0	208,0	170,0	170,0
280,0	238,0	258,0	206,0
316,0	Summe: 2882,0	Summe: 2104,0	146,0
332,0			200,0
366,0	Mittelwert: 288,2 ± 17,3	Mittelwert: 210,4 ± 18,9	Summe: 2486,0
230,0			
212,0	P = 0,5	P = 0,01	Mittelwert: 207,1 ± 9,7
310,0			
Summe: 4954,0			P = 0,01
Mittelwert: 309,62 ± 19,1			

Tabelle II

Coenzym A in µg/g Herz			
Kontrolltiere	4 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Dichloren/g Tier	24 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Dichloren/g Tier	48 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Dichloren/g Tier
128,8	99,6	79,6	82,4
104,8	95,2	89,2	75,2
103,6	112,0	78,8	94,0
106,0	104,4	96,0	87,6
86,4	92,8	93,6	92,8
96,8	109,2	109,2	88,8
53,6	108,0	98,8	84,6
79,2	108,4	104,8	104,0
120,0	78,0	70,8	74,0
103,6	84,4	70,0	91,2
72,8	Summe: 992,0	96,8	88,0
92,0		99,6	Summe: 962,6
87,2	Mittelwert: 99,2 ± 3,6	Summe: 1087,2	
110,8	P = 0,6	Mittelwert: 90,6 ± 3,7	Mittelwert: 87,5 ± 2,4
99,2		P = 0,5	P = 0,2
81,6			
Summe: 1526,4			
Mittelwert: 95,4 ± 4,5			

Tabelle II

Coenzym A in µg/g Gehirn			
Kontrolltiere	4 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Dichloren/g Tier	24 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Dichloren/g Tier	48 Std. nach i.v. Injekt. von 0,025 µMol Dichloren/g Tier
52,4	42,0	54,4	43,2
57,6	26,0	12,8	62,4
72,4	32,4	38,0	39,2
70,0	37,6	27,2	44,0
31,2	61,2	12,4	36,4
43,6	74,4	28,0	47,6
41,6	54,8	24,4	37,6
42,4	49,2	24,8	30,0
27,2	45,2	37,2	23,6
34,8	35,6	36,0	31,2
36,4	Summe: 458,4	42,0	26,4
35,2	Mittelwert: 45,8 ± 4,5	Summe: 337,2	27,2
50,0	P = 0,4	Mittelwert: 30,6 ± 3,7	Summe: 448,8
34,8		P = 0,01	Mittelwert: 37,4 ± 3,0
49,6			P = 0,1
46,4			
Summe: 725,6			
Mittelwert: 45,3 ± 3,2			

Literaturverzeichnis

1. PODOLSKY, Betty und HUTCHENS, John O.: Wirkungen von Stickstofflost auf den Stoffwechsel von Chilomonas paramaecium und Saccharomyces cerevisiae. J.Cellul.a. Comp.Physiol. 43, 229-245 (1954).

2. WHEELER, Glynn P. und SKIPPER, Howard E.: Untersuchungen über Senfgase. III. Bindung von C^{14} aus Stickstofflost-$C^{14}H_3$ in Nucleinsäurefraktionen tierischer Gewebe in vivo. Arch. of Biochem. a. Biophysics 72, 465-475 (1957).

3. DRYSDALE, R.B., HOPKINS, A., THOMSON, R.Y., SMELLIE, R.M.S. und DAVIDSON, J.N.: Einige Wirkungen von Stickstofflost und Schwefellost auf den Stoffwechsel von Nucleinsäuren in Säugetierzellen. Brit.J.Cancer 12, 137-148 (1958).

4. CRATHORN, A.R. und HUNTER, G.D.: Der Einfluß von Stickstofflost auf den Einbau von Aminosäuren in das Eiweiß von Staphylococcus aureus. Biochemic J. 67, 37-41 (1957).

5. LAWLEY, P.D.: Die relativen Reaktivitäten von Desoxyribonucleotiden und den Basen der Desoxyribonucleinsäure gegenüber alkylierenden Agentien. Biochim. et Biophysica acta (Amsterd.) 26, 450-451 (1957).

6. HAROLD, F.M. und ZIPORIN, Z.Z.: Die Wirkung von Stickstofflost und Schwefellost auf die Nucleinsäuresynthese in Escherichia coli. Biochim. et Biophysica acta (Amsterd.) 28, 482-491 (1958).

7. CLARK, C.M., GOODLAD, G.A.J. und MUNRO, H.N.: Die Wirkung von Stickstofflost auf den Aminosäureeinbau in Rattenleberprotein. Biochem. Pharmacol. 1, 213-220 (1959).

8. TRAMS, E.G.: Studien über die Rolle der Leber in der Entgiftung von Stickstofflost. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 99, 133-135 (1958).

Lebenslauf

Ich wurde am 7. Juli 1931 in Berlin geboren. Mein Vater ist Landgerichtsdirektor a.D. Seit meinem 3. Lebensjahr wohne ich in Nürnberg.

Nach 4 Jahren Volksschule und 9 Jahren Oberschule machte ich 1951 an der Mädchenoberrealschule in Fürth in Bayern das Abitur. Im Herbst 1952 begann ich an der Universität Erlangen das Medizinstudium, wo ich im Februar 1955 das Physikum und im Juli 1959 das Staatsexamen bestand. Von September 1959 bis März 1960 arbeitete ich im Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen an meiner Doktorarbeit. Seit 1. April 1960 bin ich als Medizinalassistentin an der II. Medizinischen Klinik der städtischen Krankenanstalten Nürnberg tätig.

Dorothea Faber

DRUCK:
LUDWIG MÜLLER ERLANGEN
UNIVERSITÄTSSTRASSE 9